

ВЕСЦІ

АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ
БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК

№ 2

АСОБНЫ АДЫТАК



Мінск 1992

В. М. НИКАНДРАУ, Н. С. ПЫЖОВА

ТЭРМАІНАКТЫВАЦЫЯ СТРЭПТАКІНАЗЫ

Структурна-функцыянальная спецыфіка стрэптакіназы (СК) — прадупруемага β -гемалітычнымі стрэптакокамі моцнага бялковага актывтара плазмінагену ў апошнія гады падвяргаецца інтэнсіўнаму вывучэнню. Аднак карціна ўсё яшчэ далёкая ад поўнай яснасці.

Цікавай асаблівасцю СК з'яўляецца яе значная тэмпературная ўстойлівасць [1, 2]. Разам з тым гэтае пытанне таксама раскрыта не да канца. Спробы ахарактарызаваць працэс тэрмаінактывацыі СК рабіліся радам даследчыкаў [3—7], але атрыманая імі матэрыялы носяць фрагментарны характар і не змяшчаюць якой-небудзь колькаснай ацэнкі працэсу тэрмаінактывацыі.

У сувязі з гэтым у дадзенай рабоце даследавана кінетыка тэрмаінактывацыі СК і праведзены разлік тэрмадынамічных параметраў гэтага працэсу.

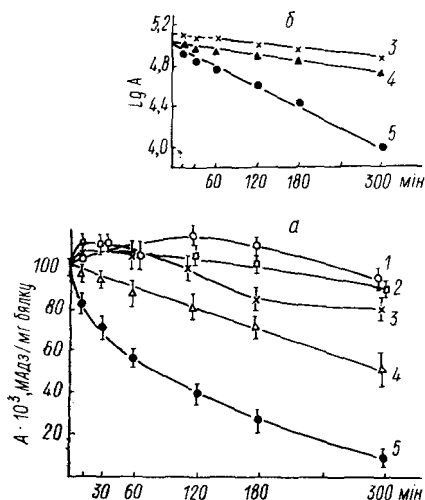
Матэрыялы і метады. СК выдзялялі з культуральнай вадкасці пасля культывавання β -гемалітычных стрэптакокаў штама Н46А на пажыўны асяроддзі складанага саставу. Электрафарэтычна гомогенныя ўзоры СК выдзялялі шляхам сорбцыі на двухвокісе крэмнію з наступнай хроматграфіяй на ДЭАЭ-цэлюлозе, як падрабязна апісана ў нашых папярэдніх работах [7]. Удзельная актыўнасць ачышчаных узораў СК адпавядала 100 тыс. МАДз/мг бялку.

Колькасць бялку ацэнвалі па велічыні абсорбцыі пры 280 нм, выкарыстоўваючы для СК значэнне $A_{1\text{см}}^{1\%} = 8,8$ [7]. Электрафарэз праводзілі ў 7,5%-ным поліакрыламідным гелі пры рН 8,3 і ў 12,5%-ным поліакрыламідным гелі ў прысутнасці 1% дадэцылсульфату натрыю, як адзначана ў нашых папярэдніх артыкулах [8].

Актыватарную функцыю СК аналізавалі метадам лізісу фібрынавых пласцін з чалавечага фібрынагена (які змяшчае плазмінаген) чалавечага трамбіну на плошчы з фібрынолізу за 20 гадз інкубацыі як падрабязна апісана ў нашых працах [9].

Раствор СК (0,5 мг/мл) інкубавалі пры тэмпературы 25, 37, 50, 75, 80 і 100 °С. У працэсе інкубацыі праз розныя прамежкі часу адбіралі алікваты.

Мал. 1. Кінетыка інактывацыі стрэптакіназы (а) у 0,06 М фасфатным буферы рН 7,0 пры 25 (1), 37 (2), 50 (3), 75 (4) і 100 °С (5) і яе паўлагаарыфмічная анамарфоза (б) канцэнтрацыя бялку 0,5 мг/мл



квоты і вызначалі астаткавую актыўнасць СК. Аналіз кінетыкі тэрмаінактывацыі і разлік тэрмадынамічных параметраў працэсу вялі па агульнапрынятых метадах [10, 11]. Эксперыменты па тэрмаінактывацыі СК праводзілі пры рН 7,4 з выкарыстаннем 0,06 М фасфатнага буферу, пры рН 4,0 — з выкарыстаннем 0,05 М ацэтатнага буферу, а пры рН 1,0 або 11,0 — з выкарыстаннем адпаведна раствораў HCl або KOH.

У рабоце выкарыстоўвалі дадцылсульфат натрыю («Serva», ФРГ), рэагенты для поліакрыламіднага геля («Reanal», Венгрыя). Астатнія рэагенты былі айчынай вытворчасці кваліфікацыі х. ч. або ч. д. а., якія падвяргалі дадатковай ачысці. Усе даследаванні праведзены не менш, чым пяціразова, вынікі падвергнуты статыстычнай апрацоўцы з вылічэннем t -крытэрыю Ст'юдэнта.

Вынікі і абмеркаванне. У водна-салавым раствору (0,06 М фасфатным буферы) пры рН 7,4 і тэмпературы 25 або 37 °С за першыя 3 гадз інкубацыі раствораў СК прыкметнага зніжэння яе актыўнасці не адбываецца (мал. 1). У працэсе інкубацыі пры больш высокай тэмпературы актыўнасць СК паступова зніжаецца, аднак пасля экспазіцыі нават пры 100 °С на працягу 3 гадз захоўваецца да 10% ад зыходнага ўзроўню актыўнасці СК. Графікі кінетыкі інактывацыі СК пры 50, 75, 80 і 100 °С здавальняюча лінеарызуецца ў паўлагарыфмічных каардынатах (мал. 1 і 2). Гэта дазваляе меркаваць, што тэрмаінактывацыя СК пры рН 7,4 падпарадкоўваецца ўраўненню кінетыкі I парадку з канстантамі хуткасці

$$k_{50^\circ} = 1,48 \cdot 10^{-3} \text{ мін}^{-1} \quad (2,47 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1})$$

$$k_{75^\circ} = 2,30 \cdot 10^{-3} \text{ мін}^{-1} \quad (3,83 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1})$$

$$k_{80^\circ} = 4,00 \cdot 10^{-3} \text{ мін}^{-1} \quad (6,67 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1})$$

$$k_{100^\circ} = 8,40 \cdot 10^{-3} \text{ мін}^{-1} \quad (14,00 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}).$$

Блізкія значэнні канстант атрыманы і зыходзячы з часу паўінактывацыі:

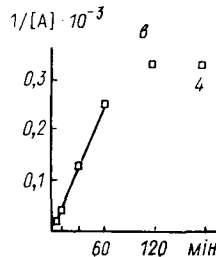
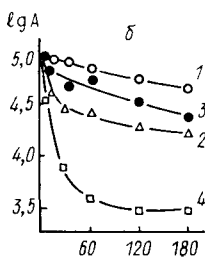
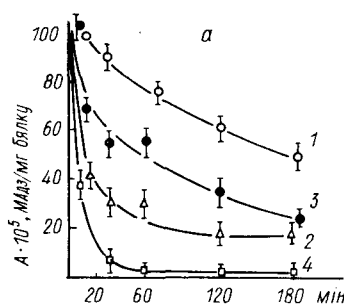
$$k_{75^\circ} = 2,30 \cdot 10^{-3} \text{ мін}^{-1}$$

$$k_{80^\circ} = 3,90 \cdot 10^{-3} \text{ мін}^{-1}$$

$$k_{100^\circ} = 9,30 \cdot 10^{-3} \text{ мін}^{-1}.$$

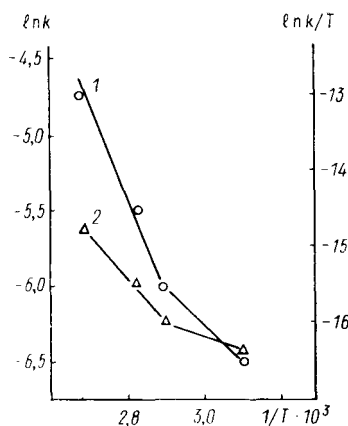
Даследаванне залежнасці лагарыфма канстанты хуткасці інактывацыі СК ад велічыні адваротнай тэмпературы паказала, што графік залежнасці здавальняюча лінеарызуецца ў дыяпазоне тэмператур 75—100 °С (мал. 3). Злом жа графіка, відаць, абумоўлены даволі высокай для эксперыментаў па тэрмаінактывацыі канцэнтрацыяй бялку.

Разлік уяўнай энергіі актывацыі інактывацыі СК даў значэнне



Мал. 2. Кінетыка інактывацыі стрэптакіназы (а) пры тэмпературы 80 °С і рН 7,4 (1), 4,0 (2), 1,0 (3), 11,0 (4), яе паўлагарыфмічная анамарфоза (б) і даследаванне залежнасці адваротнай канцэнтрацыі ад часу (в)

13,9 ккал·М⁻¹, якое ў цэлым мае той жа парадак, што і ў выпадку іншых бялкоў [12, 13]. Разлік змянення энталпіі і энтрапіі шляхам аналізу залежнасці $\ln \frac{k}{T}$ ад $\frac{1}{T}$ [10] паказаў, што графік здавальняюча лінарызуецца ў дыяпазоне тэмператур 75—100 °С, даючы з тангенса вугла нахілу значэнне энталпіі (ΔH^\ddagger), роўнае 11,4 ккал·М⁻¹ (мал. 3). Прыняўшы канстанту хуткасці інактывацыі СК пры 80 °С роўнай $6,67 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ (гл. вышэй), мы разлічылі велічыню свабоднай энергіі актывацыі пра-



Мал. 3. Вызначэнне энергіі актывацыі працэсу тэрмаінактывацыі стрэптакіназы ў 0,06 М фасфатным буферы рН 7,4 з залежнасці $\ln k$ ад адваротнай велічыні абсалютнай тэмпературы (1) і энталпіі актывацыі працэсу з залежнасці $\ln \frac{k}{T}$ ад адваротнай велічыні абсалютнай тэмпературы (2)

цэсу (ΔF^\ddagger) па стандартнай формуле [10]. Гэтая велічыня аказалася роўнай 27,5 ккал·М⁻¹. Адсюль, выкарыстоўваючы ўраўненне $\Delta F^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$, велічыня ΔS^\ddagger склала $-45,6 \text{ кал} \cdot \text{град}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ (э. адз.).

Пры змяненнях рН раствору кінетыка інактывацыі СК істотна змяняецца. Так, пры 80 °С у кіслым або шчолачным асяроддзі інактывацыя СК прыкметна паскараецца (мал. 2). У кіслым асяроддзі інактывацыя працякае па больш складанай кінетыцы, чым пры рН 7,4. Мяркуючы па характары залежнасці ў паўлагарыфмічных каардынатах, працэс інактывацыі, відаць, уключае дзве рэакцыі I парадку (першая — больш хуткая, а другая працякае з меншай хуткасцю):

$$\text{пры рН } 4,0 \quad k_1 = 5,75 \cdot 10^{-2} \text{ мін}^{-1}; \quad k_2 = 3,00 \cdot 10^{-3} \text{ мін}^{-1},$$

$$\text{пры рН } 1,0 \quad k_1 = 5,23 \cdot 10^{-2} \text{ мін}^{-1}; \quad k_2 = 6,74 \cdot 10^{-3} \text{ мін}^{-1}.$$

Велічыні канстанты хуткасці другой рэакцыі пры гэтых значэннях рН блізкія да такой пры рН 7,4 (гл. вышэй).

Кінетыка інактывацыі СК пры рН 11,0 не лінарызуецца ў паўлагарыфмічных каардынатах (мал. 2). У той жа час адрэзак крывой да 60 мін (інактывацыя $\sim 95\%$) здавальняюча лінарызуецца ў каардынатах $\frac{1}{[A]}$ ÷ t, што дазваляе меркаваць пра адпаведнасць яе ўраўненню

кінетыкі II парадку. Гэтае меркаванне ўзгадняецца з залежнасцю перыяду паўінактывацыі ($t_{1/2}$) ад часткі зыходнай актыўнасці: пры $[A_0]/4$ адрэзак часу роўны $2t_{1/2}$, а пры $[A_0]/8$ — $4t_{1/2}$ [11]. Знойдзенае значэнне канстанты хуткасці рэакцыі адпавядае $2 \cdot 10^{-6} \text{ МАдз} \cdot \text{мін}^{-1}$.

Атрыманыя матэрыялы сведчаць аб тым, што пры рН 7,4 і тэмпературы больш за 40 °С інактывацыя СК працякае ў адпаведнасці з ураўненнем I парадку. Праведзеныя намі даследаванні метадамі спектраскапіі кругавога дыхраізму і ўласнай трыптафанавай флуарэсэнцыі, аднак, сведчаць аб адносна невялікіх змяненнях у гэтых умовах другой, традыцыйнай структур СК і стану яе трыптафаназмяшчальных участкаў [7].

Прынята лічыць, што тэрмаінактывацыя энзімаў адбываецца або па прычынах канфармацыйнага характару (хаатычная зборка глобулы

бялку), або з прычыны разрыву кавалентных сувязей [14, 15]. Магчыма і спалучэнне гэтых фактараў. Матэрыялы нашых даследаванняў [7] сведчаць аб здольнасці СК захоўваць функцыянальную актыўнасць нават пры глыбокай разупарадкаванасці яе прасторавай структуры. Таму з вядомай доляй імавернасці можна дапусціць, што пры $\text{pH} \sim 7,0$ тэрмаінактывацыя СК залежыць ад дэзамініравання астаткаў Asp і Glp або вызначасца разрывам сувязей Asp-X, як гэта мае месца ў выпадку лізацыму, РНКазы [14, 16].

Аднак магчымы і іншы шлях тэрмаінактывацыі СК, зыходзячы з аналізу сукупнасці атрыманых намі матэрыялаў аб канфармацыйнай рухомасці малекулы СК пры ўздзеянні розных фізіка-хімічных фактараў [7, 8, 17—19]. Гэтыя матэрыялы даюць падставу для наступнай мадэлі (у першым прыбліжэнні) структурнай арганізацыі СК. Макрамалекула СК складаецца з некалькіх абласцей — даменаў, адзін з якіх з'яўляецца адносна невялікім, структурна рыгідным і трыптафанзмяшчальным. У гэтым дамене лакалізаваны ў дадатна заражаных «кішэнях» паверхні глобулы 4 астаткі трыптафану, гетэрагенныя па мікраакружэнні, другая структура, відаць, складаецца пераважна з β -выгінаў і неўпарадкаванага клубка. Відаць, гэты дамен змяшчае таксама частку астаткаў тыразіну і паблізу ад яго лакалізаваны атам металу пераманнай валентнасці (жалеза). Адзначаны трыптафанзмяшчальны дамен характарызуецца значнай устойлівасцю да пашкоджваючых уздзеянняў, аднак разгледжаны працэс тэрмаінактывацыі СК пры $\text{pH} 7,0$ можа быць абумоўлены змяненнямі стану металзмяшчальнага ўчастка малекулы СК, што рэзка не адбываецца на структуры рыгіднага дамена.

Ускладненне кінетыкі тэрмаінактывацыі СК у кіслым асяроддзі, відаць, абумоўлена шматстадыйнасцю працэсу. Ва ўсякім выпадку, менавіта з апошняй звязваюць ускладненне кінетыкі інактывацыі [20]. Спецыяльныя даследаванні сведчаць аб тым, што пры тэрмаінактывацыі энзімаў менавіта ў кіслым асяроддзі істотную ролю адыгрывае разрыў пептыдных сувязей тыпу Asp-X [17, 19]. Можна меркаваць, што менавіта гэты працэс рэалізуецца ў ходзе першай, больш хуткай фазы тэрмаінактывацыі ў кіслым асяроддзі. У такім выпадку, відаць, у малекулы СК можа існаваць некалькі «стратэгічных» для функцыянальна актыўнай малекулы сувязей тыпу Asp-X. Калі гэта дапушчэнне правільнае, то тэрмаінактывацыя СК пры $\text{pH} \sim 7,0$ (канстанта хуткасці яе блізкая да такой другой фазы тэрмаінактывацыі ў кіслым асяроддзі) павінна рэалізоўвацца па іншаму механізму.

Адной з прычын тэрмаінактывацыі СК пры $\text{pH} 11,0$ можа быць утварэнне аграгатаў бялку. Фарміраванне апошніх са значным зніжэннем функцыянальнай актыўнасці СК апісана і ў нейтральнай зоне pH пры працяглым захаванні яе раствораў без стабілізуючых дабавак [21]. Другой жа прычынай тэрмаінактывацыі СК пры $\text{pH} 11,0$ можа быць пашкоджанне структурна рыгіднай вобласці малекулы бялку. Спецыяльнымі даследаваннямі [19] было вызначана, што менавіта ў шчолачным асяроддзі награванне раствору СК прыводзіць да поўнага знішчэння спектра кругавога дыхраізму ў бліжэйшай УФ-вобласці. Аднак нам уяўляецца, што першы механізм узгадняецца з тэрмаінактывацыяй СК пры $\text{pH} 11,0$ па кінетыцы другога парадку.

Такім чынам, атрыманая намі матэрыялы даюць колькасную характарыстыку тэрмаінактывацыі СК пры $\text{pH} 7,4$, а таксама ў кіслым і шчолачным асяроддзі. Аналіз фактычных даных дазваляе выказаць рад меркаванняў для глумачэння механізма тэрмаінактывацыі СК. Аднак раскрыццё гэтага механізма, улічваючы шматграннасць працэсу тэрмаінактывацыі, патрабуе спецыяльных паглыбленых даследаванняў, у тым ліку даследаванняў стану структурна рыгіднага дамена СК і яе металзмяшчальнага ўчастка.

Summary

Streptokinase thermoinactivation was studied at pH 7.4, 4.0, 1.0 and 11.0 and with protein concentrations of 0.5 mg/ml. Inactivation constants (at 50°, 75°, 80°, 100 °C), the process activation free energy changes, enthalpy and entropy were evaluated. Possible mechanisms of streptokinase thermoinactivation are discussed.

Літаратура

1. Кони́ков А. П. // Детские капельные инфекции: Тр. Ин-та эпидемиологии микробиологии и гигиены им. Пастера, Л., 1953. С. 35—46.
2. Christensen L. R. // J. Gen. Physiol. 1947. Vol. 30, N 6. P. 465—473.
3. Martin M. // Thromb. Diathes. Haemorrh. 1975. Vol. 33, N 3. P. 586—596.
4. Martin M., Auel H. // Anaesthesist. 1977. Vol. 26, N 10. P. 564—568.
5. Торчи́лин В. П. Новые физико-химические подходы к получению стабилизированных физиологически активных соединений: Автореф. дис. ... докт. хим. наук. М. 1980.
6. Rattke W., Brosch U., Boyde P. // Folia Haematol. 1986, Bd 113, N. 1-2 S. 99—107.
7. Нікандраў В. М., Вараб'ёва Г. В., Янкоўская Г. С. і інш. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1986. № 6. С. 47—52.
8. Никандров В. Н., Казючиц О. А. // Биохимия. 1988. Т. 53, № 3. С. 508—515.
9. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотьяков В. И. // Вопросы мед химии. 1987. Т. 33, № 1. С. 84—87.
10. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1976.
11. Шмид Р., Сапунов В. Н. Неформальная кинетика. М., 1985.
12. Жоли М. Физическая химия денатурации белков. М., 1968.
13. Метелица Д. И., Еремин А. Н. // Успехи химии. 1987. Т. 56. № 11. С. 1921—1948.
14. Ahern T. J., Klibanov A. M. // Science, 1985, Vol. 228, N 4705. P. 1280—1284.
15. Klibanov A. M. // Chemtech. 1986. Vol. 16, N 6. P. 354—359.
16. Zale St. E., Klibanov A. M. // Ann. NY Acad. Sci. 1986. Vol. 434. P. 20—26.
17. Нікандраў В. М., Вараб'ёва Г. В. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1984. № 5. С. 74—78.
18. Нікандраў В. М., Вараб'ёва Г. В., Янкоўская Г. С., Балодзіна І. А. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1990. № 5. С. 73—79.
19. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Янковская Г. С. // VI конференция по спектроскопии биополимеров: Тез. докл. Харьков, 1988. С. 222—223.
20. Greco G., MARRUCCI G., Grizzuti N., Gianfreda L. // Ann. NY Acad. Sci. 1986. Vol. 434. P. 7—19.
21. Gerlach D., Kohler W. // Folia Haematol. 1979. Bd 106, N. 5-6. S. 908—914.

*БелНДІ эпідэміялогіі і мікрабіялогіі
Міністэрства аховы здароўя Беларусі*

*Паступіў у рэдакцыю
26.07.91*